

## ***Brettanomyces*, vecchia conoscenza, nuove acquisizioni**

Il *Brettanomyces*, ormai possiamo dire vecchia conoscenza, nonostante tutto il lavoro fatto su di lui e contro di lui negli ultimi anni, non sempre è di facile controllo e non è certamente un problema superato. Per questo può essere interessante fare il punto sullo stato delle conoscenze, dei mezzi di prevenzione e di lotta a nostra disposizione.

Il lievito *Brettanomyces bruxellensis* è in grado di produrre numerosi composti che alterano i vini.

Accanto ai noti 4-etil-fenolo e 4-etil-guaiacolo responsabili delle tanto discusse note animali produce anche altri composti meno noti quali:

Le tetraidopiridine responsabili del gusto definito di topo;  
Acidi grassi a media catena, che esaltano la percezione delle note animali generate dagli etil fenoli;

Gli acidi grassi ottanoico e decanoico, forti inibitori dei batteri lattici responsabili della FML;

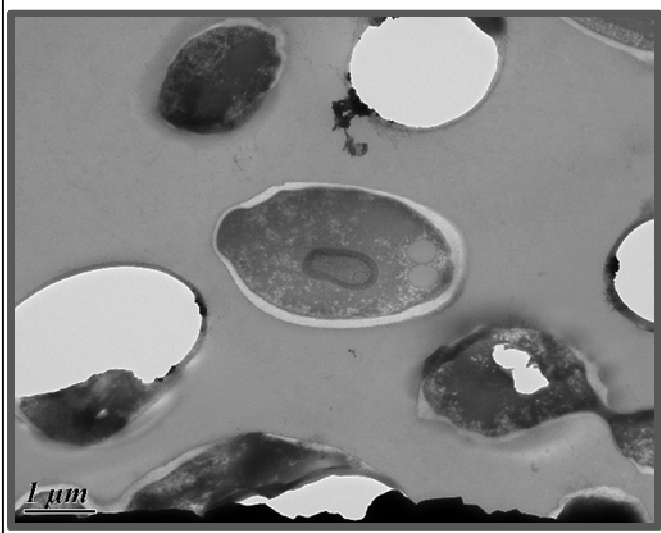
Ammine biogene quali putrescina ed agmatina, responsabili di alterazioni organolettiche.

### **Fase fermentativa**

E' ormai chiaro e risaputo che il Brett arriva in cantina dal vigneto, pertanto già in vigneto un'attenta conduzione che punti rigorosamente alla sanità dell'uva è fondamentale per ridurre la contaminazione microbica nei mosti.

Studi recenti hanno messo in evidenza anche una certa correlazione con la data di raccolta. In una sperimentazione in cui si è messo a confronto il controllo microbiologico di uve provenienti dalla stessa parcella e raccolte anticipatamente, al momento ottimale e tardivamente, si è visto come la

Figura 1: Cellula di *Brettanomyces* su substrato modello vista al microscopio elettronico x 20000



raccolta tardiva porti ad uve più ricche di microrganismi e tra questi una maggior presenza di Brett. A fine fermentazione la carica di lieviti non-Saccharomyces, tra cui il Brett, si mantiene più alta nel vino prodotto da uve raccolte tardivamente. Stessa tendenza si registra a carico dei fenoli volatili analizzati sul vino dopo un anno. Si confermano infatti essere a livelli più alti nei vini provenienti dal lotto tardivo.

Questo fatto viene spiegato dai ricercatori in due modi. Essendo il mosto da uve tardive più ricco di microrganismi indigeni in generale, è caratterizzato da una maggiore produzione di composti combinanti la solforosa, che dunque successivamente, a parità di SO<sub>2</sub> totale, ne avrà una minor percentuale libera, attiva nei confronti dei microrganismi. Pertanto la maggior presenza iniziale nel vino "tardivo" di *Brettanomyces* e la minor attività della SO<sub>2</sub> portano inevitabilmente ad una maggiore produzione di fenoli volatili indesiderati.

Durante la FA è di estrema importanza garantire al *Saccharomyces cerevisiae* inoculato un'attività regolare, non dobbiamo trascurare che il *Brettanomyces* resta in agguato in attesa di un suo passo falso. Per questo le alte concentrazioni zuccherine, con le difficoltà fermentative che possono comportare, ne fanno aumentare il rischio. Ecco perché di primaria importanza la corretta gestione della nutrizione del lievito, la gestione delle temperature, dei rimontaggi, dell'ossigenazione, ecc.

Al termine della fermentazione alcolica i lieviti *Saccharomyces* declinano e lasciano l'ecosistema a disposizione di altri microrganismi che nella fattispecie possono essere i batteri preposti alla fermentazione malolattica o ancora il Brett. A seconda delle loro condizioni a fine fermentazione alcolica uno dei due prenderà il sopravvento, se saranno i batteri avremo una FML spontanea, se sarà il Brett avremo dei problemi. Più i batteri tardano ad impiantarsi maggiore tempo e spazio ha il Brett per svilupparsi e se la popolazione di Brett si sviluppa si accumuleranno nel vino maggiori quantità di prodotti di inibizione.

Ecco perché in questa fase, ovviamente volendo far fare al vino la malolattica, l'impiego di un buon ceppo di batteri è il miglior strumento a nostra disposizione per il controllo del Brett. L'inoculo di un buon ceppo di batteri introduce nell'ecosistema una popolazione che si impone numericamente sulle altre impedendo lo sviluppo del Brett ed accelerando i tempi della FML.

Tradizionalmente l'inoculo dei batteri si fa alla svinatura o subito dopo. Per ridurre il rischio è possibile anticiparlo. Inoculando i batteri appena dopo l'inoculo dei lieviti (24 h dopo l'avvio della fermentazione) l'ecosistema è perfettamente protetto, non si ha ne fase di latenza ne vuoto microbiologico tra fine FA e inizio FML. In questo caso si parla di co-inoculo precoce.

E' anche possibile aggiungere i batteri verso la fine della

fermentazione alcolica, quando restano gli ultimi 20 – 30 g/L di zucchero da consumare. La popolazione dei lieviti è ormai in declino, i batteri selezionati si insediano proteggendo completamente l'ecosistema, fino al completamento della FML. In questo caso si parla di co-inoculo tardivo.

Se non si vuol ricorrere al co-inoculo, e a fine fermentazione, dopo svinatura, ci si ritrova con una popolazione piuttosto alta di *Brettanomyces*, prima di inoculare i batteri, si può cercare di ridurre la popolazione con un leggero collaggio al vino, ad esempio con 20 – 30 ml/hL di Gecoll Supra, oppure se la popolazione è già troppo elevata ricorrendo a una filtrazione non troppo stretta.

### Fase post-fermentativa

Tutti gli sforzi realizzati a monte devono essere mantenuti durante l'affinamento, periodo decisivo per la stabilizzazione microbiologica del vino, anche quando le fermentazioni si sono svolte e chiuse perfettamente.

E' importante tenere in considerazione le interazioni e gli equilibri che regolano la vita dei microrganismi. Non è corretto cercare di ottenere una sterilità immediata, ma piuttosto ridurre progressivamente la carica microbica per arrivare, al momento dell'imbottigliamento, con un vino esente da *Brett*.

La prima tappa essenziale è la solfitazione post-fermentativa. Come già sappiamo l'effetto protettore della SO<sub>2</sub> è strettamente legato al pH del vino e al di sotto di 0,5 mg/L di SO<sub>2</sub> molecolare si considera che il vino non sia correttamente protetto contro il *Brett*. Il primo solfitaggio è di grande importanza perché impone condizioni avverse allo sviluppo del *Brett*.

In seguito il livello di SO<sub>2</sub> deve essere controllato e riaggiustato regolarmente, soprattutto in corrispondenza di travasi o altre lavorazioni al vino. Se il vino è in barrique particolare attenzione deve essere fatta al vino di colmatura sul quale si può anche fare una sovra solfitazione (40 – 50 mg/L di SO<sub>2</sub> libera). Il tutto deve sempre essere gestito con un occhio al pH, che in alcuni casi deve essere opportunamente corretto con un'adeguata acidificazione.

Non si deve dimenticare che l'efficacia della SO<sub>2</sub> è legata anche al suo grado di combinazione conseguente alla presenza nel vino di composti combinanti.

Tra i composti che combinano maggiormente la solforosa abbiamo certamente l'aldeide acetica e l'acido piruvico i cui tenori possono essere abbassati con una corretta gestione della FML. Si è infatti visto come i batteri selezionati inoculati precocemente siano in grado di degradare parte dei composti combinanti la solforosa, abbassandone il tenore anche del 20%.

La solforosa non può comunque da sola assicurare la protezione nei confronti del *Brett*, ma deve essere associata ad altre precauzioni.

Non dobbiamo dimenticare che i travasi sono tappe chiave nella prevenzione del Brett, in quanto permetto-



no di allontanare le cellule che si depositano nelle vasche insieme alle fecce.

L'impiego di enzimi in fase di vinificazione, ma anche di enzimi da affinamento tipo EXTRALYSE, che inducono l'eliminazione di tutti quei polimeri che rallentano le precipitazioni (pectine e glucani) permette una più veloce sedimentazione e migliore compattamento delle fecce, quindi una migliore pulizia dei vini al momento dei travasi, con un più efficace allontanamento dei microrganismi.

L'altro travaso importante è quello che precede l'estate, prima dell'innalzamento della temperatura, fattore propizio allo sviluppo microbiologico.


Il collaggio stesso può risultare uno strumento utile al contenimento della popolazione microbica. Permette infatti di imprigionare nei flocculi di sedimentazione le cellule dei microrganismi che sono così agevolmente eliminati con il travaso. Accanto a prodotti tradizionali come le gelatine e l'albumina sono disponibili anche prodotti più innovativi quali il Polymust Press o il Vegecoll che bene figurano anche in questo ruolo.

Ovviamente il mantenimento di condizioni igieniche generali ottimali, il controllo delle temperature e degli apporti di ossigeno devono essere sempre garantiti.

### OENO Brett : La soluzione

Sempre più oggi si cerca di evitare o comunque ridurre l'impiego di solforosa e malgrado il suo impiego uno sviluppo accidentale di *Brett* può verificarsi comunque. In tal caso di estremo interesse ed efficacia risulta l'impiego di OENOBRETT. Si tratta di prodotto specifico per il controllo del *Brettanomyces*, messo a punto da Laffort. E' formulato a base di chitosano e di preparato enzimatico beta-glucanasi. La sua efficacia è stata dimostrata e confermata in diverse prove dimostrative ed applicazioni, utilizzando il formulato alla dose di 10 g/hl, popolazioni anche consistenti di *Brettanomyces* vengono decimate nel giro di 8 – 10 gg evitando così la produzione o l'ulteriore accumulo di etil fenoli (tabella 1).

Tabella 1 : Risultato di trattamento con chitosano (Oenobrett) su due vasche infettate.

	Vasca 27	Vasca 29		Vasca 27	Vasca 29
PCR quantitativa Brett (Eq. UFC/mL)	5,6.10 <sup>3</sup>	4,2.10 <sup>3</sup>	Dopo 8 giorni 	Non rilevato	Non rilevato
4-EP+4-EG (µg/L)	608	56		562	56

Anche di fronte ad una popolazione importante, di 10<sup>5</sup> UFC un trattamento con 10 g/hL di Oenobrett porta ad un drastico abbattimento della

popolazione e l'eventuale popolazione residua si dimostra non essere più in grado di indurre aumento di etil-fenoli.

Inoltre si è osservato che se, il vino non trattato dopo trattamento che resta a contatto con il residuo di Oenobrett, va accidentalmente incontro ad una ricontaminazione, non si registra comunque nessun sviluppo della popolazione inquinante, che resta sotto controllo, così come la concentrazione di etil-fenoli che non subisce nessun incremento.

Nonostante la sua efficacia sia conclamata, il suo meccanismo d'azione sui microrganismi non è ancora del tutto chiaro, così come la tipologia di microrganismi coinvolti nella sua azione.

E' tuttavia chiaro che l'avvio di una FML risulta pressoché impossibile dopo l'impiego del chitosano, anche a distanza di 6 mesi è ancora difficile se non impossibile, far partire una malo-lattica pur operando un consistente inoculo di batteri.

La filtrazione sterile così come la pastorizzazione dei vini sono metodi efficaci per eliminare le cellule di *Brettanomyces* nell'immediato. Il problema consiste invece nel fatto che il vino così trattato si dimostra molto sensibile a un'eventuale ricontaminazione. Sembra che il vino così trattato, libero da ogni popolazione microbica, avendo la nicchia ecologica completamente sgombra diventi facile preda del primo microrganismo che si presenta, che spesso in questa fase è proprio il *Brett*. Per questo detti trattamenti, se e quando ritenuti necessari, vanno confinati alle ultime fasi prima dell'imbottigliamento, quando i rischi di ricontaminazione sono veramente limitati.

#### Osservazioni al microscopio elettronico.

Allo scopo di comprendere meglio il meccanismo di azione del chitosano di origine fungina nel controllo delle popolazioni di *Brettanomyces* sono stati condotti interessanti studi utilizzando anche la tecnica dell'osservazione al microscopio elettronico.

L'attività del chitosano sembra essere legata ai fenomeni di adsorbimento delle cellule sul polimero. Valutazioni fatte con la misura del potenziale Zeta hanno confermato che il chitosano al pH del vino assume carica positiva, mentre le pareti cellulari del lievito sono caricate negativamente. Questo adsorbimento sembra essere la causa dell'alterazione della struttura delle pareti cellulari a cui segue l'aumento della permeabilità della membrana. Confermando pertanto l'effetto reale del chitosano sul *Brettanomyces* si evidenzia come non si tratti di un meccanismo semplice, ma entrino in gioco differenti meccanismi operanti in sinergia e combinazione.

Seguendo con microscopio elettronico a trasmissione (MET a 20.000 ingrandimenti) l'evoluzione della struttura di cellule di *Brettanomyces* nel corso degli 8 giorni che seguono il trattamento con 10 g/hl di Oenobrett, si può osservare la progressiva degenerazione delle strutture, che porta alla morte delle cellule.

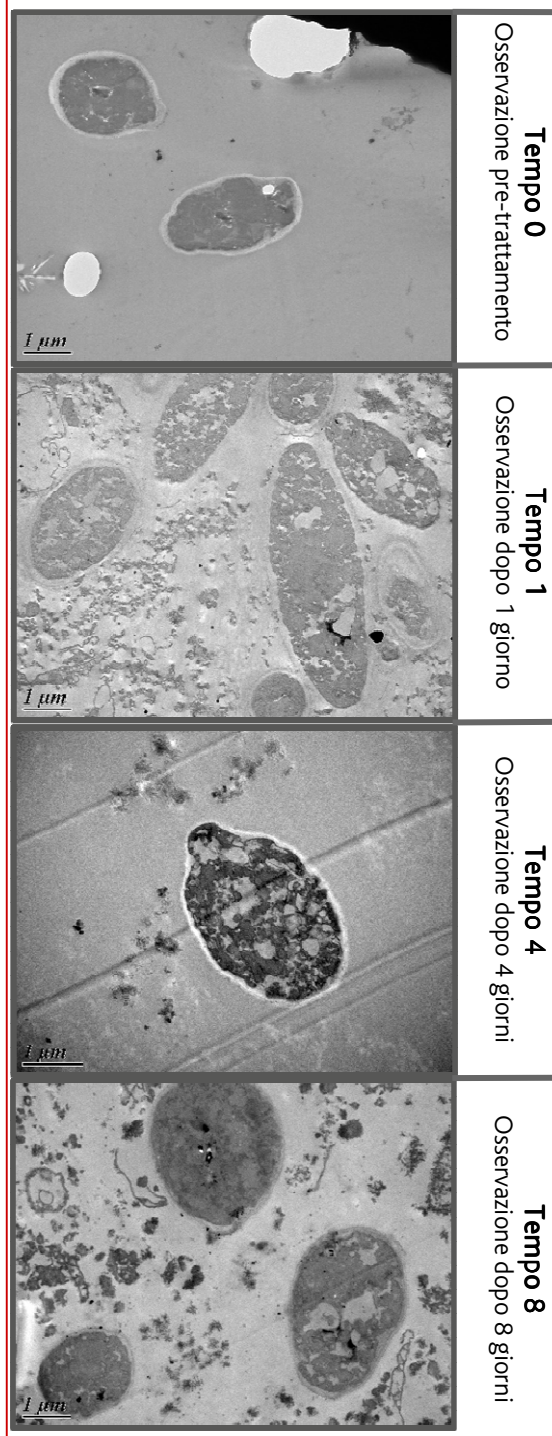
Sul vino non trattato le cellule mostrano strutture intatte dunque vitali. Già dopo le prime 24 ore dal trattamento si vede come la presenza del chitosano induca una certa disorganizzazione cellulare con deterioramento sia della parete che della membrana.

Al quarto giorno si evidenzia un avanzamento del processo degenerativo che all'ottavo giorno è inequivocabile. La maggior parte delle cellule non presenta più strutture parietali né membrane funzionanti e vitali.

Lungo tutto il processo di vinificazione, anche allo scopo di verificare l'eventuale effetto di trattamenti con OENOBRETT, è di grande utilità poter disporre di controlli analitici mirati alla conta delle cellule attive di *Brett*. Si può ricorrere alla PCR, all'epifluorescenza, alla citometria di flusso o alla coltura in piastra su substrato specifico. Ogni tecnica ha i suoi pro ed i suoi contro.

Qualunque sia la tecnica adottata va utilizzata per seguire una cinetica di popolazione, non serve avere un semplice dato puntuale frutto di un'analisi isolata. Per esempio se da un'analisi rilevo 100 UFC/ml di

Figura 2 : Evoluzione della struttura cellulare dei *Brettanomyces* nel corso degli 8j successivi il trattamento con 10g /hL d'Oenobrett® - MET (x 20 000)



*Brettanomyces*, per capire se il dato è allarmante o confortante devo sapere come era la popolazione in precedenza. Se al controllo precedente avevo rilevato 1000 UFC/mL, posso essere piuttosto rassicurato che la popolazione è in regresso, se per contro in precedenza avevo 10 UFC/mL mi devo allarmare perché la popolazione nefasta è in crescita e devo elaborare una strategia efficace al suo contenimento.



# OENOBrett®

Si tratta di un preparato a base di chitosano ed enzima beta-glucanasi appositamente studiato e messo a punto da LAFFORT per la lotta contro il *Brettanomyces*



Il trattamento è da predisporre dopo che le attività microbiologiche desiderate sono concluse (dopo FA ed eventuale FML), utilizzando il prodotto alla dose di 10 g/hl. In base al regolamento CE la dose massima è di 25 g/hL.

## Applicazione

Effettuare il trattamento dopo che le fermentazioni si sono concluse nel modo desiderato (sia FA che FML).

Disperdere il preparato in un volume d'acqua pari a 10 volte il suo peso o pari volume di vino, a temperatura ambiente, utilizzando un recipiente pulito e di materiale inerte.

Introdurre la soluzione nel vino, avendo cura di disperdere in modo omogeneo il prodotto in tutta la massa del vino da trattare.

Durante il periodo di trattamento, stimabile intorno agli 8 gg, mantenere la temperatura del vino stabile e superiore ai 10°C.

Se necessario operare il travaso solo dopo che sono trascorsi almeno 8 giorni dall'inizio del trattamento.

## Uso

Curativo: in caso di contaminazione accidentale già avvenuta (rilevamento di presenza di cellule con uno dei diversi metodi proposti) intervento con dose di 10 g/hl il prima possibile e nuovo controllo della popolazione dopo circa 10 gg dall'inizio del trattamento.

Preventivo: in tutti quei casi in cui l'impiego di una certa dose di prodotto ci può aiutare ad evitare il problema:

- vini provenienti da parcelle su cui storicamente si rileva il problema;
- vini utilizzati per la colmatatura di botti e barrique;
- su vini torchiati notoriamente più ricchi di cellule microbiche e di zuccheri residui ;
- situazioni in cui si misurano pH elevati, con conseguente bassa attività della SO<sub>2</sub>;
- vini a fine affinamento per i quali non si prevedono filtrazioni sterilizzanti;
- affinamento sulle fecce in sicurezza.....

## Per una facile applicazione di OENOBrett ai vini conservati in barrique

Prodotto direttamente re-idratante nella confezione per il trattamento di 2,5hL di vino. Il dispenser contiene 20 confezioni da 25 g utilizzabili separatamente.



### Applicazione in 4 semplici tappe



1 REMPLIR / FILL IN



2 AGITER / SHAKE



3 VERSER / POUR



4 BÂTONNER / STIR

OENOBrett®  
LAFFORT  
l'œnologie par nature